# Versuche zur Züchtung der Choleravibrionen.

---

**Inaugural-Dissertation**

zur

**Erlangung der Doctorwürde in der Medizin und Chirurgie,**

welche

mit Genehmigung der hohen medizinischen Fakultät

der

Vereinigten Friedrichs-Universität

Halle-Wittenberg

**Donnerstag, den 9. August 1906, Vormittags 10 Uhr**

öffentlich vortragen wird

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

**Karl Besser**
approb. Arzt
aus **Quedlinburg.**

---

Halle a. S.
Hofbuchdruckerei von C. A. Kaemmerer & Co.
1906.

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Halle.

Referent: Prof. Dr. **Fraenkel.**

**W. Roux**
Decan.

Seit im Jahre 1895 das Agglutinationsverfahren von Gruber und Durham für die Diagnose der Cholera asiatica empfohlen wurde, hat sich in der Stellung dieser Diagnose ein gewisser Umschwung vorbereitet.

Bis dahin war abgesehen von der mikroskopischen Betrachtung der lebenden Choleravibrionen im hängenden Tropfen und des gefärbten Präparates massgebend für die bakteriologische Diagnose der asiatischen Cholera in Sonderheit die Gelatineplatte gewesen.

Seine hauptsächlichste Ergänzung fand diese in dem von Schottelius 1885 angegebenen Verfahren.

Bekanntlich ist dieses im Gegensatz zu den Gelatineplatten ein Anreicherungsverfahren, das in zahlreichen Fällen die Diagnose in 6 Stunden sicher mikroskopisch stellen lässt. Von Schottelius war zunächst Bouillon empfohlen worden. Von Dunbar ist dann Peptonwasser in alkalischer Reaktion für diese Zwecke angegeben worden.

Diesem combinierten Peptonwasser-Gelatineplattenverfahren misst Flügge 1893 den hervorragendsten Wert bei der Diagnose bei. Die sicher gestellte Diagnose nimmt nach seiner Angabe 20—26 Stunden Zeit in Anspruch.

Auch Gruber erklärt in seiner Arbeit über den gegenwärtigen Stand der Choleradiagnose 1893, dass er das Aussehen typischer Kulturen von Cholera auf der Gelatineplatte bisher noch bei keiner Vibrioart anderer Herkunft getroffen habe. Es war also die Gelatineplatte für ein Differentialdiagnostikum zwischen echten Choleravibrionen nnd choleraähnlichen von autoritativer Seite anerkannt worden.

Ebenso einig waren die Autoren in der Verurteilung der Agarplatte für die Choleradiagnose. Ich erwähne z. B. Friedrich 1893, der die Agarkulturen als in keiner Weise charakteristisch erklärt. In der obenerwähnten Arbeit schreibt Gruber: Unmöglich ist es auch, aus dem Aussehen der Agarkultur einen Schluss auf die Vibrioart zu ziehen. Der diagnostische Wert der Agarkultur ist daher mit dem der Gelatinekultur nicht zu vergleichen. Gruber verwirft die Agarkultur ebenso wie den Gelatinestich, die Kartoffelkultur, die Bouillonkultur, die Milch, die Reaktion mit Lackmusbouillon, die Indolreaktion und den Tierversuch. Massgebend allein ist ihm die 10 % Gelatine.

In der neueren Zeit haben sich diese Verhältnisse zweifellos unter dem Einfluss des Agglutinationsverfahrens wesentlich geändert.

In der Differentialdiagnose, besonders auch gegenüber den choleraähnlichen Vibrionen, ist die Agglutination allgemein als ungleich sicherer als die Gelatineplatte anerkannt. Andererseits ist man auf die doch nicht unbedingte Zuverlässigkeit der letzteren mehr und mehr aufmerksam geworden, wie Kolle im klinischen Jahrbuch 1903 erschöpfend behandelt.

Jetzt ist die Agarplatte mehr in den Vordergrund gerückt, die bei 37° im Brutraum im Gegensatz zur Gelatineplatte gehalten werden kann und darum in viel kürzerer Zeit imstande ist, isolirte Kolonieen zu liefern, die natürlich zwecks endgültiger Diagnose der Agglutinationsprobe unterworfen werden müssen. Man verzichtet eben mehr oder weniger darauf, durch kulturelle Verfahren die Differentialdiagnose zwischen echten Choleravibrionen und choleraähnlichen zu stellen und verlangt nur, dass auf festen Nährböden in möglichst kurzer Zeit einzelstehende Kolonieen vorhanden sind, die gegenüber anderen nicht zur Vibrionengruppe gehörenden Darmmikroorganismen möglichst deutlich gekennzeichnet sind. Dieses Verlangen erfüllt aber der gewöhnliche Bouillonagar nur bis zu einem gewissen Grade. Zwar sind die echten Choleravibrionen und die cholera-

ähnlichen durch ihre eigentümliche Transparenz und ihren Farbenton gegenüber den gewöhnlichen Darm- und Wasserbakterien ziemlich deutlich unterschieden. Aber die Deutlichkeit dieser Transparenz ist doch grossen Schwankungen unterworfen. Ferner schreibt Koch von einer hell-graubraunen Transparenz, mir fiel zuweilen auch ein mattbläuliches Aussehen der Kolonieen auf.

Endlich ist auf dem gewöhnlichen Bouillonagar allen in menschlichen Darm vegetierenden Bakterien unbeschränkte Wachstumsmöglichkeit geboten, sodass auch Koch erklärt, ein Erkennen weniger im Ausstrich vorhandener Vibrionen ist ausgeschlossen. Koch hält auch aus diesem Grunde die Agarplatte zum Ausstreichen des Ausgangsmaterials für wenig geeignet und will die Agarplatte dazu benutzt wissen, dass aus der 6—10 stündigen Peptonwasserkultur Kulturen angelegt werden, um nach weiteren 8—10 Stunden geeignetes Material zur Weiterbehandlung zu liefern. Diese Angaben macht Koch in seiner Arbeit über den gegenwärtigen Stand der Choleradiagnose im Jahre 1893, also vor dem Bekanntwerden der Agglutinationsmethode. Für diese, namentlich für die quantitative, reichen aber 8 bis 10 stündige Kulturen nicht aus, vielmehr sind hierzu wohl mindestens 12—14 stündige Kulturen nötig. Sicher ist, dass der Bouillonagar als fester Nährboden für die Choleradiagnose durchaus nicht derartig vollkommen ist, dass man sich mit ihm zufrieden geben kann, vielmehr bleibt es nach wie vor ein Verdienst, einen Nährboden zu schaffen, auf dem sich Vibrionenkolonieen deutlich abheben und der zum Aussäen auch vom Ausgangsmaterial dienen könnte. Dieser dankenswerten Aufgabe haben sich in der jüngsten Zeit zwei Posener Autoren, Hirschbruch und Schwer unterzogen.

Als sie das Wachstum der sämtlichen Bakterien, die ihnen aus der Sammlung des Posener hygienischen Institutes zur Verfügung standen, auf den von v. Drigalski und Conradi für die Typhusdiagnose empfohlenen Lack-

muskristallviolettmilchzuckeragar prüften, fanden sie, dass die Vibrionen der Cholera asiatica stets in schönen blauen Kolonien auf der Platte erschienen, an Ueppigkeit des Wachstums und in Grösse der einzelnen Kolonie denen auf gewöhnlichem Bouillonagar nicht nachstehend.

Es ist eigentlich sonderbar, dass das biochemische Verhalten der Choleravibrionen nicht schon früher zwecks Einführung in die praktische bakteriologische Diagnostik gründlicher studiert wurde. Haben doch schon seit geraumer Zeit mehrere Autoren Untersuchungen über das Verhalten des Choleravibrio bei Zusatz verschiedener Zuckerarten zum Nährboden angestellt mit besonderer Rücksicht auf Bildung von Säure beziehungsweise Alkali des Vibrio und ebenso ist zur Erkennung dieses Verhaltens stets Lackmus verwendet worden.

Bereits 1885 hatte Buchner in seiner Nachprüfung des Emmerich'schen Neapler Kommabacillus durch Lackmuszusatz zum rohrzuckerhaltigen Nährboden festgestellt, dass der Vibrio Kochi wie der in Frage stehende Bacillus Säure bildeten.

Dieses Phänomen wurde freilich bei einem Aufenthalt der Kultur im Brutraum von 37° immer erst am 3. oder 4. Tage beobachtet, also einem Termine, der für praktische Zwecke sehr spät liegt.

Dieser Feststellung von Säurebildung tritt Behring entgegen. Nach ihm ist die Farbe der Lackmusgelatine und der Lackmusbouillon zu abhängig von der Concentration des Lackmuszusatzes. Nun zeigt sich ferner eine Reduktion des Nährbodens meist durch Aufhellung an, die dann in Rotfärbung übergeht. Aufhellung bez. Reduktion der genannten Nährböden seien wiederum so schwer festzustellen, dass Buchner, wie Weisser, der Buchners Untersuchungen nachprüfte, eine Reduktion garnicht haben feststellen können. Behring führte daher den Lackmuszusatz zum festen Nährboden, dem Agarnährboden ein. Er giebt nun an, dass er stets nur Alkalibildung beim Vibrio Koch und Vibrio

Finkler habe feststellen können. Er macht aber keine Angaben über die Zusammensetzung seiner Nährböden, an denen er die Menge Alkali austitrierte, die die beiden Vibrionen gebildet hatten. Jedenfalls wird er Zucker besonders nicht zugesetzt haben. Wenigstens scheint mir das aus der Bemerkung hervorzugehen, dass in solchen Kulturen, die Zucker enthalten, recht beträchtliche Säurebildung auch bei solchen Bakterien gefunden werden kann, die ohne Zuckerzusatz die Alkalescenz vermehren.

Smith kommt auf Grund seiner Versuche zu dem Resultat, dass zur Säurebildung überhaupt Zucker nötig ist, dass Zucker aber in den meisten Nährböden vorhanden und seine Menge grosse Schwankungen unterworfen sei, sodass sie häufig zur Säurebildung nicht ausreiche. Daher erklären sich auch die verschiedenen Angaben der Autoren über Alkali und Säurebildung der Bakterien. Auch Smith bedauert, dass Behring auf diese Verhältnisse nicht näher eingegangen sei. Smith nimmt zwei nebeneinander herlaufende Processe an, eine schnelle Säurebildung, die mit der Zuckerspaltung einhergeht, und eine langsamere Alkalibildung, die mit der Vermehrung der Bakterien bei Sauerstoffzufuhr einhergeht. Die oben erwähnten Buchnerschen Versuche, gegen die Behring seine Einwände erhebt, stützen sich nun aber ausschliesslich auf Nährböden, die einen besonderen Zuckerzusatz erhalten haben. Aus Buchners Protokollen ist ferner zu entnehmen, dass ein Unterschied zwischen verschiedenen Zuckerarten obwaltet. Buchner fand beim Vibrio Koch, dem Emmerichschen Neapler Kommabacillus, dem Vibrio Proteus Säurebildung nur bei Rohrzuckerzusatz zum Nährboden, bei Milchzuckerzusatz machte sich dagegen beim Vibrio Koch und Vibrio Proteus eine Alkalibildung bemerkbar.

Mit diesen Angaben stimmt durchaus überein, was Gosio gefunden hat. Auch er hatte sich von der Säurebildung des Vibrio Koch in glukosehaltigem Nährboden

überzeugt und prüfte nunmehr sein Verhalten gegenüber anderen Zuckerarten.

Er konnte dann feststellen, dass im rohrzuckerhaltigen Nährboden bereits weniger Säure gebildet wurde, noch weniger bei Zusatz von Maltose, schliesslich bei Milchzucker war eine Säurebildung überhaupt nicht mehr nachweisbar.

Petruschky giebt sogar an, in schwach alkalischer Kochsalzlösung, die mit dem Vibrio Koch geimpft war, einen Umschlag der Farbe ins rötliche beobachtet zu haben, allerdings meint er, dass es sich dabei wohl um $CO_2$ gehandelt habe. Bei der von ihm angegebenen Molke fand er zunächst Säure, dann verstärkt Alkali.

Ganz analoge Verhältnisse haben von Drigalski und Conradi bei Bac. typhi getroffen. Sie fanden, dass dieser Säure gebildet hatte beim Zusatz von Traubenzucker, Fruktose, Galaktose, Xylose, Maltose, Mannit zum Lackmusagar; dagegen Alkali beim Zusatz von Traubenzucker, von Dulcit, Arabinose, Rhamnose, Rohrzucker, Milchzucker, Amylum, Inulin.

Solchen Befunden entspricht es, wenn Smith schreibt, wenn wir eine Klassifizierung der Bakterien als Säure bezw. Alkalibildner versuchen, müssen wir die Zusammensetzung der Nährböden genau ins Auge fassen, auf die auch schon Petruschky aufmerksam macht.

Nach solchen vorangegangenen Versuchen lag es wohl nahe genug, den von Drigalski-Conradischen Agar, der bei der Typhusdiagnose sich so sehr bewährt hatte, auch auf seine Fähigkeiten für die Choleradiagnose zu prüfen.

Die zahlreichen Versuche, die Hirschbruch und Schwer mit ihm angestellt haben, führten sie schliesslich zu einem von ihnen als Choleraspecialagar benannten Nährboden, der sich nur in wenigen Punkten, von dem von Drigalski-Conradischen Agar unterscheidet.

Eine Nachprüfung desselben, zu der die beiden Autoren auffordern, hat Herr Geheimrat Fraenkel mir liebenswürdigerweise übertragen.

Um mich zu orientieren, prüfte auch ich zunächst das Wachstum der Choleravibrionen auf dem Typhusagar.

Die Kulturen, die mir bei meinen Untersuchungen zur Verfügung standen, waren die älteren Stämme der Sammlung des Institutes, als Cholera 36, Chol. Klein, Chol. El Tor, Chol. Ficker, Chol. Freiburg und Chol. Duisburg, ferner ein jüngerer Stamm Chol. Berlin benannt und ausserdem die Stämme 64, 70, 121, 122, 139, 181, 188, 218, 331 der Epidemie 1905, die Herr Geheimrat Fraenkel so gütig war, mir aus Berlin kommen zu lassen.

Zum Ausstrich benutzte ich Peptonwasserkulturen und 18stündige Agarkulturen, die von 6stündigen Peptonwasserkulturen hergestellt waren.

Nach 14stündigem Aufenthalt im Brutraum bei 37°, waren auf den verschiedenen Platten, die mit Chol. 36, Klein, Ficker, Freiburg beschickt waren, ferner Vibrio Metschnikoff, Vibrio Finkler-Prior, nur Kolonieen zu sehen, die etwa Sandkorngrösse hatten, dagegen einen Durchmesser von 1 mm, wie es Hirschbruch und Schwer gefunden hatten, nie erreichten. Auch die Platten, die mit Material von den anderen Stämmen geimpft waren, waren nicht viel anders. Ueberall war bei der ersten Besichtigung nach 10 Stunden — der Vorschrift der beiden Autoren entsprechend — nur eben eine Andeutung von Wachstum und zuweilen ein ganz feiner Rassen bei dichterer Aussaat zu sehen, sodass ich schon jetzt annehmen zu müssen glaubte, dass eine praktische Verwertung, nach 10stündigem Aufenthalt bei 37° nicht sonderlich fruchtbringend sein könnte. Dabei meinte ich allerdings bei einem Nährboden, der durch Farbzusatz, auch bei Verwendung von höchstens 10—12 ccm für eine Platte, gegenüber dem gewöhnlichen Bouillonagar an Durchsichtigkeit eingebüsst hat, der ausserdem die Differentialdiagnose zwischen verschiedenen Kolonieen durch eine Farbreaktion erleichtern soll, eine Grösse von etwa 1 mm

Durchmesser die Kolonieen für praktische Zwecke verlangen zu müssen. v. Drigalski und Conradi stellen auch an ihren Nährboden nicht das Verlangen, dass die darauf gewachsenen Typhuskolonieen schon nach 10 Stunden der praktischen Diagnose dienstbar gemacht werden, sondern erst nach 14—16 Stunden. Am deutlichsten sei der Unterschied nach 20—24 Stunden.

Bei der zweiten Besichtigung nach 20 Stunden zeigten dann in Sonderheit die neuen Stämme Kolonieen von 1 mm Durchmesser eine bei Aufsicht und Durchsicht schön himmelblaue, oft auch dunkler blaue Farbe. Ein besonders deutlicher Unterschied zwischen der Farbe der Kolonie und der des Nährbodens war nicht zu sehen. Namentlich vermisste ich eine intensivere Blaufärbung des Nährbodens in der nächsten Umgebung der Kolonie, die durch die Alkalibildung des Choleravibrio hervorgerufen sein sollte.

Was das weitere Wachstum der Choleravibrionen auf dem Lackmuskrystallviolettmilchzuckeragar betrifft, so fanden sich nach 48 Stunden teils tiefblaue Kolonieen, teils solche mit einem gräulichem Schimmer, der etwas ins Grüne hinüberspielt. Später habe ich auf der von Hirschbruch und Schwer angegebenen Modifikation des Agars stets gefunden, dass schon am 2. Tage die Cholerakulturplatte einen grünlichen Farbenton annahm, der in kurzer Zeit sehr intensiv wurde. Eine so tiefblaue Farbe, die bei Aufsicht schwarz erschienen wäre, habe ich nur einmal beobachtet.

Dieselben Resultate lieferten mir die Versuche, die mit dem oben erwähnten Choleraspecialagar nach Hirschbruch-Schwer angestellt wurden.

Die Vorschrift, die für denselben in den Hauptpunkten gegeben worden ist, ist die Folgende:*)

---

*) Bei der Herstellung der Nährböden leistete mir die Hülfsassistentin am hyg. Institut, Frln. H. Siegel, tatkräftig Hülfe, wofür ich ihr an dieser Stelle aufrichtigsten Dank sage.

20 gr Stangenagar, 10 gr Liebigs Fleischextrakt, 10 gr Peptonum siccum (Witte) und 5 gr Kochsalz werden mit 1 l Leitungswasser in einem Kolben $1^1/_2$ Stunden lang gekocht. Nachdem der Inhalt bis auf 45–50 Grad abgekühlt ist, wird das zu Schnee geschlagene Eiweiss eines Eies hinzugegeben. Dann kocht man kurze Zeit und filtriert und sterilisiert. 15 gr Milchzucker giebt man pro Liter zum heissen Agar, schüttelt tüchtig und kocht $^1/_4$ Stunde lang. Mit einer 10 % sterilisierten Lösung kristallisierter Soda wird alsdann der Nährboden auf den Lackmusneutralpunkt gebracht und dann noch 9 ccm dieser Lösung pro l hinzugegeben. Es erfolgt nunmehr der Zusatz von 130 ccm sterilisierter Lackmuslösung und von 10 ccm einer ebenfalls sterilisierten 0,1 % Lösung von Kristallviolett (B) Höchst.

Im wesentlichen unterscheidet sich also dieser Nährboden vom v. Drigalski-Conradischen durch den Mangel an Nutrose, die auf das Wachstum der Choleravibrionen nachteilig wirken soll, und durch den geringeren, 2 % Gehalt an Agar.

Diese letztere Vorschrift hat folgenden Grund: v. Drigalski und Conradi haben empfohlen, den Gehalt an Agar bei ihrem Nährboden gegenüber dem gewöhnlichen Bouillonagar um $1^1/_2$ % zu erhöhen, um einer allzu intensiven Diffusion der vom Bact. coli gebildeten Säure in die Umgebung ein Hindernis zu bieten. Dadurch wird erreicht, dass die wenig Alkali bildenden Typhusbacillen auch bei schwach ausgeprägter Eigenfarbe sich doch deutlich von den roten Colikolonieen als blaue Kolonieen abheben konnten. Ganz entsprechend war für die auf dem Milch-Zuckeragar stärker Alkali producierenden Choleravibrionen die Vorschrift, den Agargehalt auf 2 % zu lassen.

Dadurch wurde die Diffusion der durch Colikolonieen gebildeten Säure erleichtert und die durch eine reichlichere Alkalibildung frühzeitig gebläuten Cholerakolonieen konnten sich durch den so hervorgerufenen starken Farbenkontrast nur deutlicher abheben.

Die zum Nährboden benutzte Bouillon war zum Teil auch aus Pferdefleisch hergestellt. Ein Unterschied zwischen dieser und der Fleischextraktbouillon machte sich zunächst nicht bemerkbar.

Bezüglich des Eiweises hielt ich es für erlaubt, mich an die Gewohnheit des Institutes zu halten und auf 1 Liter Nährboden 3 gr getrockneten Eiweisses zu verwenden, das zunächst im Wasser gelöst und dann zum abgekühlten Agar gegeben wurde.

Auch auf diesem Nährboden war das Wachstum **nach 10 Stunden** ein derartig geringes, dass weder eine makroskopische Diagnose, noch eine praktische Verwertbarkeit der Kolonieen möglich erschien. Wohl aber waren die Kolonieen nach 20 Stunden meist reichlich 1 mm im Durchmesser gross und intensiv blau gefärbt. Die Resultate, die ich dann bei Versuchen mit Gemischen von Coli und Cholera erhielt, waren den eben beschriebenen entsprechend. Während nach 10 Stunden das Wachstum meist nur angedeutet war, nach 14 Stundten neben 1 mm im Durchmesser grossen Coli Kolonieen, die den Nährboden mehr oder weniger deutlich gerötet hatten, bezw. selbst rot aussahen, sich andere Kolonieen schon ziemlich deutlich abhoben, die aber noch keine Eigenfarbe erkennen liessen und mir sehr häufig Verwechselungen veranlassten, konnte ich nach 20—22 Stunden die ausgezeichnetsten Unterscheidungsmerkmale feststellen. So z. B. giebt folgendes Protokoll über eine Platte, die mit Coli und Colera Klein beschickt, 22 Stunden bei 37° getanden hat, an: abgesehen von der Randzone, die infolge der dickeren Nährbodenschicht noch rötlich violett erscheint, sieht die Platte vorwiegend blau aus. Zwischen sehr blassen, nur schwach rötlichen Kolonieen, die auch in der Randzone nicht anders gefärbt erscheinen, finden sich zahlreiche bis zu 1 mm im Durchmesser messende blaue Kolonieen zerstreut, die in der Randzone violett gefärbt

sind. Deutlicher Unterschied von der als Controlle angelegten Coli und Typhusplatte ist vorhanden, auf der noch deutliche rote Kolonieen mit roter Umgebung zu sehen sind. Bei Durchsicht lässt der Nährboden, abgesehen von der Randzone, keine Eigenfarbe erkennen, während die bei Aufsicht blauen Kolonieen auch bei Durchsicht blau erscheinen. Sie sind also selbständig blau. Auf der Platte Coli und Cholera 74 tritt besonders deutlich hervor, dass der Nährboden gerade dort, wo Cholerakolonieen stehen, eine bei Aufsicht und Durchsicht gleich auffallend blaue Farbe angenommen hat.

War es mir also auch nicht möglich, nach 10 Stunden brauchbare Resultate zu bekommen, so erscheinen doch die Eigentümlichkeiten des Wachstums in den folgenden 10 Stunden so ausgeprägt, dass es wohl wert erschien, festzustellen, in welcher kürzesten Zeit dieselben von den Kolonieen erreicht würden. Gleichzeitig versuchte ich, ob ich den Nährboden nicht dadurch etwas tüchtiger machen könnte, dass ich ihn mit Rindfleischbouillon herstellte, ein Versuch, der, wie ich später las, nur der Vorschrift v. Drigalskis und Conradis entspricht. Es wäre wohl zunächst näherliegend gewesen, den Kristallviolettzusatz zu verringern, davon sah ich ab, um nicht durch eine noch höhere Verdünnung des Kristallvioletts dem Wachstum anderer verunreinigender Bakterien Wege zu bahnen.

Die Herstellung des Rindfleischagars geschah in der folgenden Weise: anderthalb Pfund Rindfleisch wurden mit einem Liter Wasser übergossen und 24 Stunden ausgelaugt, dann coliert. Der Rückstand mit $^1/_2$ Liter Wasser noch einmal etwa $^1/_2$ Stunde ausgekocht, dann wieder coliert. Beide Filtrate wurden alsdann 1 $^1/_2$ Stunden unter Zusatz von Pepton und Kochsalz gekocht, filtriert und in der üblichen Weise weiter behandelt.

Die Resultate, die ich auf dem so hergestellten Nährboden erhielt, waren von den früheren, wenn auch nur

wenig, so doch in etwas unterschieden, nämlich in den Grössenverhältnissen.

Gerade die Platten, die mit Coli und Cholera und zwar den Stämmen Berlin, 121, 139, 181, 218 beschickt waren, zeichneten sich dadurch aus, dass auf ihnen zwei morphologisch verschiedene Kolonieen nach 10 Stunden gewachsen waren, unter denen das geübte Auge leicht die kleineren, punkt bis klein stecknadelkopfgrossen, stark glänzenden für Cholerakolonieen ansprach, während die anderen für Coli zu haltenden Kolonieen grösser, sehr flach, schlecht begrenzt und matt erschienen.

Durch diese verhältnismässig leicht zu stellende Differentialdiagnose unterschieden sich die Choleraplatten besonders auch von den anderen Platten, die mit Coli und Typhus und Coli und Kruse beschickt waren.

Dagegen war von einer Farbveränderung selbst auf der Colireinkulturplatte noch keine Rede nach 10 Stunden. Nach 20 Stunden war auch hier das oben mehrfach erwähnte Bild der zwei Farben vorhanden.

Es war also wohl nicht zu verkennen, dass nach 10 Stunden für den Geübten eine Differentialdiagnose möglich war, nur nicht auf Grund des typischen Verhaltens der verschiedenen Kolonieen auf dem Lackmusmilchzuckernährboden, das doch denselben zu einem Choleraspecialagar stempeln soll.

Ich gehe nunmehr über zur Beschreibung von Versuchen, die ich mit Stuhlaufschwemmungen machte, die mit Choleravibrionen vermischt worden waren.

Um eine nicht zu dichte Aussaat zu erhalten, wurde eine starke Oese Stuhl in einen Kubikcentimeter 0,85 % Kochsalzlösung verrieben, der ausserdem eine Oese Choleraaufschwemmung beigemischt wurde. Diese letztere enthielt zumeist auf ein Kubikcentimeter 0,85 % Kochsalzlösung $^1/_2$ Oese einer 18 stündigen Agarkultur.

Da es mir nunmehr darauf ankam, den Eintritt der deutlichen Farbreaktion festzustellen, so verzichtete ich auf die Besichtigung nach 10 Stunden, eine Zeit, zu der das Wachstum differentialdiagnostische Merkmale noch nicht hervorgebracht hatte und die ausserdem recht ungünstig lag, da doch in den folgenden Stunden eine wiederholte Untersuchung nötig war, und beschränkte mich in den meisten Fällen darauf, die Platten nach 13–15 Stunden anzusehen.

Diese Beobachtungen haben ergeben, dass nach 14 Stunden die Colikolonieen stets rot erschienen und den Nährboden in ihrer Umgebung ebenfalls mehr oder weniger gerötet hatten, so dass die Cholerakolonieen, die zu dieser Zeit meist eine Grösse von 1 mm im Durchmesser erreicht hatten, in ihrer schönen, himmelblauen, zuweilen auch dunkler blauen Farbe bei Aufsicht wie bei Durchsicht stets sehr deutlich zu erkennen waren und die Differentialdiagnose in der Tat keine besonderen Schwierigkeiten bereitete. Ich möchte jedoch bemerken, dass die von den Colikolonieen gebildete Säure zu dieser Zeit meist noch nicht soweit in die Umgebung diffundiert war, das sie an die nächsten Cholerakolonieen heranreichte. Der Gegensatz, gegen den die blauen Kolonieen auf rotem Grunde bieten, fehlte also noch. Doch waren die verschiedenen Kolonieen an ihren bezüglichen Unterschieden durchaus zu erkennen.

In späteren Stunden traten dann allerdings, vorausgesetzt, dass die Choleraaussaat gegenüber der Coliaussaat nicht allzu reichlich geworden war, auf dem diffus rosa gefärbten Nährboden die blauvioletten Cholerakolonieen bei Tageslicht wie bei Auerlicht prächtig in Erscheinung.

Umgekehrt trat auch ein sehr typisches Bild auf, wenn einmal die Coliaussaat gegenüber der Choleraaussaat zu gering bemessen war. Die Säurebildung trat dann als Rotfärbung überhaupt nicht hervor, die Platte war besäet mit typisch intensiv blauen Kolonieen, zwischen denen sich

einige andere Kolonieen, die nach der Kontrolle offenbar nur Colikolonieen sein konnten, wie weisse Flecke ausnahmen.

In solcher Farbenkonstellation hielten sich die Platten meist 48 Stunden. War die Choleraaussaat sehr reichlich, so trat häufig schon am 2. Tage leichte Grünfärbung ein. Auf einzelnen Platten war diese Umfärbung ebenfalls an gewissen Stellen zu beobachten, wenn eine solche beim Ausstreichen besonders reichlich mit Choleravibrionen bedacht worden war. War die Choleraaussaat geringer, so war oft noch nach mehreren Tagen das typische Bild des geröteten Nährbodens mit den blauen Kolonieen zu sehen. Die Colikolonieen selbst blassten meist schon frühzeitig ab, etwa am 2. Tag. Sie sahen dann trübe, milchig, mattrosa aus, um schliesslich auf einem wieder blau gewordenen Nährboden selber auch eine milchige, trübe, blaue Farbe anzunehmen.

Weiterhin wurde das Bild dann noch dadurch kompliziert, dass die Choleravibrionen verschieden aussehende Kolonieen bildeten, analog ihrem Verhalten auf gewöhnlichem Agar. Nie aber habe ich ein derartiges Verhalten in den ersten 20 Stunden bei 37° gesehen, sodass es also praktisch keine Bedeutung hat. Nur einmal sah ich auch, aber erst nach etwa 5 Tagen, die Cholerakolonie derartig dunkelblau gefärbt, dass sie bei Aufsicht auf dunkler Unterlage schwarz aussah.

Auch vermisste ich die grünlich-blaue Farbe der wieder alkalisch gewordenen Colikolonie, wie es Hirschbruch angiebt. Grüne Farbe habe ich am frühesten bei Cholerareinkulturen gesehen Diese namentlich bezüglich der ersten Besichtigung nach 14 Stunden zufriedenstellenden Resultate erzielte ich hauptsächlich mit den neuen Stämmen der diesjährigen Epidemie. Von den Stämmen der Sammlung versagten Cholera El Tor, Freiburg, Ficker fast vollkommen durch ihr ungenügendes Wachstum, ein Umstand, der wohl darauf zurückzuführen ist, dass diese

Stämme in der Sammlung des Institutes doch schon jahrelang von Agar auf Agar fortgezüchtet wurden.

Wir sahen also, dass die Kolonieen der Choleravibrionen auf dem von Hirschbruch und Schwer empfohlenen Specialagar mit gewissen charakteristischen Eigenschaften wachsen, an denen man sie stets vom Bakterium Coli wieder unterscheiden wird. Es bleibt noch festzustellen, wie es mit der Unterscheidung der echten Choleravibrionen von den choleraähnlichen und anderen pathogenen Darmbakterien steht.

Bezüglich der choleraähnlichen Vibrionen ist zu sagen, wie auch Hirschbruch und Schwer angeben, dass sie sich in nichts von den Kulturen der echten Choleravibrionen unterscheiden. Diesen Mangel dürfte man heute nach Einführung der Agglutination nicht mehr so schwer empfinden. Es darf eben heute die bakteriologische Diagnose auf Cholera asiatica nicht gestellt werden, ohne dass die Agglutinationsprobe gemacht worden ist. Nicht viel anders steht es mit der Frage, wie sich der Bac Typhi, Paratyphi, Kruse gegenüber dem Choleravibrio auf dem Agar verhalten. Es ist zunächst Hirschbruch und Schwer wohl recht zu geben, dass eine bakteriologische Differentialdiagnose zwischen Typhus, Dysenterie oder Cholera in praxi wohl nur sehr selten vorkommt. Sollte es aber wirklich nicht möglich gewesen sein, Cholera klinisch auszuschliessen, so trifft doch hier wohl dasselbe zu, was oben bei der Differentialdiagnose zwischen echten Choleravibrionen und choleraähnlichen gesagt worden ist. Auch bei der Typhusdiagnose wird sich heute niemand im fraglichen Falle mit dem Kulturverfahren begnügen. Einige Versuche, die das Wachstum anderer im Darm vorkommender Bakterien betreffen, mögen immerhin erwähnt sein. Von dem Stamm Faecalis alcaligenes, der mir zu Gebote stand, erzielte ich nur so feine, zarte Kolonieen, dass auch nach 22 Stunden eine Verwechslung mit Cholerakolonieen ausgeschlossen

schien. Desgleichen der Bac. Kruse, der in matten, tautropfenähnlichen Kolonieen wuchs.

Nur in Gruppen stehende und confluierende Kolonieen zeigten einen matten, bläulich-weissen Schimmer, die einzelnen erschienen farblos. Kaum von Cholerakolonieen zu unterscheiden sind, wie auch Hirschbruch und Schwer angeben, die Typhus- und Paratyphusbacillen. Ist auch die blaue Farbe derselben meist nicht so intensiv blau wie bei den Cholerakolonieen, mehr milchig getrübt, so sind sie doch so verschieden, die Uebergänge so mannigfaltig, dass eine makroskopische Differentialdiagnose nicht möglich ist. Etwas besser waren die Platten zu unterscheiden, wenn sich auf ihnen Mischungen von Coli, Typhus, Paratyphus, Kruse bezw. Cholera, wie oben schon einmal kurz erwähnt wurde, befanden, desgleichen wenn es sich um Stuhlaufschwemmungen handelte.

Bei einem Versuch mit Coli und Paratyphus war es auffallend, dass, obwohl das Zahlenverhältnis der ausgesäeten Coli- und Paratyphusbacillen durchaus nicht erheblich verschieden war von Coli und Cholera, doch auf der Paratyphusplatte die Colikolonieen durch eine viel deutlichere Rotfärbung der Kolonieen, wie besonders des Nährbodens in den Vordergrund traten. Die als Paratyphus in Frage kommenden Kolonieen waren, obwohl $^1/_2$—1 mm etwa gross, bei Aufsicht völlig farblos, tautropfenähnlich, während die Cholerakolonieen deutlich ihre blaue Farbe erkennen liessen. Ebenso zeigten die Krusekolonieen nach 14 Stunden nur einen blassen, bläulichen Schimmer und waren mit Cholerakolonieen kaum zu verwechseln, bei Auerlicht waren sie überhaupt nicht sichtbar. Eine deutliche blaue Eigenfarbe hatten sie erst nach 60 Stunden angenommen. Bezüglich eines Stuhltyphusgemisches kann ich nur sagen, dass nach 15 Stunden die Typhuskolonieen bei Durchsicht blass, beinahe milchig blau erschienen.

Da es sich hier um einen der Versuche handelt, die ich gleichzeitig mit Typhus, einem echten Choleravibriostamm

und einem choleraähnlichen anlegte, so mag er in kurzer Uebersicht folgen:

| Farbe | Cholera | Typhus | Vibr. hassana |
|---|---|---|---|
| des Nährbodens | blau | violett | violett |
| der Colikolonie | weiss | rosa | rosa |
| der Umgebung der Colikolonie | Schimmer von rosa | deutlich rosa | rosa |
| der bezüglich. Kolonie | sattblau | blass etwa milchig, blau | blau |

Leider ist dieses Resultat insofern nicht als Norm hinzustellen, als sowohl die Choleraaussaat, wie die Typhusaussaat sehr reichlich war und die Coliaussaat bei weitem übertraf.

Nicht unerwähnt möchte ich einen Stuhlbefund lassen, weil er bezüglich der darin gefundenen Bakterien gegenüber den Choleravibrionen von Interesse ist. Bei einigen Versuchen fiel es auf, dass bereits auf der Controlle neben typhischen Colikolonieen gleich grosse blaue Kolonieen gewachsen waren, die sogar um sich herum eine blaue Zone erzeugten. Trotzdem waren diese nach 14—15 Stunden von den Cholerakolonieen mit Leichtigkeit zu unterscheiden, auch dann, als es sich einmal fast ausschliesslich um derartige Kolonieen handelte. Diese waren der Cholerakolonie gegenüber dadurch gekennzeichnet, dass sie sie an Grösse weit übertrafen, dabei viel flacher waren und eine viel mattere, mehr milchige blassblaue Farbe zeigten. Die Cholerakolonieen waren stets, soweit es sich um die richtige Dicke des Nährbodens handelte, an ihren Characteristica zu erkennen: sie zeigten die weit dunklere Farbe, waren klein, glänzend und sassen wie ein Stecknadelknopf der Oberfläche auf.

Ich habe nunmehr einige praktische Fragen zu erledigen.

Zunächst, wie soll das Ausgangsmaterial verwendet werden? Die oben angegebene Methode, eine Oese Stuhl auf 1 ccm 0,85 % Kochsalzlösung zu geben und von dieser Aufschwemmung aus Platten auszustreichen, dürfte nicht ausreichend sein. Ich hatte mir deshalb für mehrere Versuche einen dicken Stuhlbrei hergestellt und dazu eine Stuhlmenge benutzt, die etwa die Grösse einer Kirsche hatte. Diesen Brei prüfte ich auf seine Alkalescenz, machte ihn gegebenen Falls alkalisch und verrieb in ihm 1 Oese einer 18—24stgen. Kultur.

Von diesem künstlichen Cholerastuhl brachte ich alsdann eine Oese auf eine Platte, strich das Material mit dem von v. Drigalski angegebenen Glasspatel aus und verwandte den eben benutzten Spatel noch für eine 2. Platte und weiter in derselben Weise für eine 3. Platte. Mit dieser Methode erhielt ich oft schon auf der 2., besonders aber auf der 3. Platte sehr schöne übersichtliche Bilder. Ebenso gut erschien mir das Verfahren nach v. Drigalski und Conradi, die eine kleinere Menge Stuhl mit steigenden Mengen 0,85% Kochsalzlösung versetzten und von diesen Aufschwemmungen je 1 Oese auf einer Platte ausstrichen. Ausserdem streiche man in praxi von den Peptonwasserkulturen, die obligatorisch bei jedem zur Untersuchung gelangenden Falle angelegt werden müssen, nach 6 Stunden mehrere Platten aus. Man erhält alsdann nach 12—14 Stunden, wie ich erprobte, solche Kulturen, dass mit ihnen die makroskopische, quantitative Agglutination angestellt werden kann.

Was das zum Ausstreichen zu benutzende Instrument anlangt, so erwies sich freilich die Platinöse nicht als das geeignetste; dagegen habe ich den von v. Drigalski und Conradi angegebenen Glasspatel so schätzen gelernt, dass ich von demselben während meiner sämtlichen Versuche nicht abgewichen bin.

Bezüglich der Dicke des Nährbodens halte auch ich für die gewöhnliche Grösse der Petrischen Schalen von

10 ccm im Durchmesser 10—12 ccm für die geeignetste Menge. Eine geringere Menge, etwa 8 ccm, halte ich nicht für ausreichend. Die Nährbodenschicht ist alsdann derartig dünn, dass eine Eigenfarbe besonders bei Durchsicht garnicht zu erkennen ist. Dass dabei eine Farbenveränderung früher zu konstatieren gewesen wäre, habe ich bei meinen Besichtigungen, die bei diesen Specialversuchen von der 9. Stunde an stündlich erfolgten, nicht bemerkt.

Eine Menge von 15 ccm mochte noch angehen, bei 18 oder gar 20 ccm war die Farbe des Nährbodens dann derartig dunkel, dass selbst in der von mir verlangten Zeit von 14 Stunden eine Rotfärbung nur sehr schwer zu sehen war und die blauen Cholerakolonieen ebenfalls nur sehr undeutlich in Erscheinung traten. Voraussetzung ist bei Verwendung von nur 10—12 ccm Nährboden eine gleichmässige Dicke der fest gewordenen Platte, mit anderen Worten ein vollkommen ebener Boden der Petrischen Schale. Es erscheint mir durchaus nicht unwichtig, zumal bei einem gefärbten Nährboden gerade auf diese Eigenschaft hin die zur Benutzung gelangenden Schalen genau auszuwählen, um nicht auf ein und derselben Platte infolge der verschiedenen Dicke der Nährbodenschicht einen verschiedenen Intensitätsgrad zu haben.

Ausserdem wird das Ausstreichen des Materials sehr erschwert, wenn die Nährbodenschicht an einer Stelle zu dünn ausgefallen ist, ein Einreissen ist dann kaum zu vermeiden, selbst auch beim Ausstreichen mit dem Glasspatel.

Wie vordem erwähnt worden ist, unterscheiden sich auf dem Lackmusmilchzuckeragar die Kolonieen der echten Choleravibrionen durch nichts von den choleraähnlichen Vibrionen. Das Kulturverfahren bedarf also der Ergänzung durch die Agglutination.

Da aber der Nährboden einen Zusatz von Kristallviolett erhalten hat, um das Wachstum zahlreicher anderer im menschlichen Darm vorkommender Bakterien zu hemmen, so war zu befürchten, dass die Choleravibrionen durch diesen

Nährbodenzusatz doch irgendwie gelitten haben konnten, etwa derartig, dass ihre Agglutinabilität ungünstig beeinflusst sein könnte. Ich habe daher mit einigen der neuen Stämme vergleichende Untersuchungen darüber angestellt, ob ein diesbezüglicher Unterschied zwischen dem Bouillonagar und dem Specialagar besteht. Ich erhielt dabei folgende Resultate:

| Cholera | Specialagar | Gewöhnlicher Agar |
|---|---|---|
| 70 | nach 2 Std. 37° 1 : 3200<br>„ 6 „ 37° 1 : 6400 | nach 2 Std. 37° 1 : 6400 |
| 121 | „ 1 „ 37° 1 : 5000<br>„ 24 „ 37° 1 : 6400 | „ 1 „ 37° 1 : 5000<br>„ 24 „ 37° 1 : 6400 |
| 139 | spont. 1 : 1600<br>„ 1½ „ 37° 1 : 3200<br>„ 24 „ 37° 1 : 6400 | spont. 1 : 3200<br>„ 1½ „ 37° 1 : 6400 |
| 64 | „ 1 „ 37° 1 : 3200<br>„ 2 „ 37° 1 : 3200<br>„ 24 „ 37° 1 : 6400 | „ 1 „ 37° 1 : 3200<br>„ 2 „ 37° 1 : 3200<br>„ 24 „ 37° 1 : 6400 |
| 188 | „ 1½ „ 37° 1 : 3200<br>„ 24 „ 37° 1 : 6400 | „ 1½ „ 37° 1 : 3200<br>„ 24 „ 37° 1 : 6400 |

Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist bei einem Serum vom Kaninchen mit dem Titer 1 : 6400 nur in den höhergradigen Verdünnungen ein zeitlicher Unterschied in dem Eintreten der Agglutination zu sehen. Da nun für den Ernstfall das Serum dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin zu entnehmen ist, das ein Serum vom Titer 1 : 10000 liefert und mit dem Verdünnungen nur bis 1 : 2000 anzustellen sind, so kommt der geringe von mir gefundene Unterschied zwischen den beiden Nährböden für die praktische Diagnose wohl nicht in Betracht. Die orientiernde Agglutinationsprobe im hängenden Tropfen habe ich meist

von der Stuhlmischplatte aus angelegt und dabei stets positive Resultate erzielt. Bei dieser Probe ist vor allem Wert darauf zu legen, so wenig als nur möglich Material zu verwenden. Mit sehr feiner Nadel berühre man oben die Kolonie. Geht man nicht in dieser Weise vorsichtig zu Werke, so treten unweigerlich nicht zerriebene Klümpchen im Tropfen auf, die ein klares Bild unmöglich machen. In den meisten Fällen war es dann nötig, die Tropfen auf $^1/_2$ Stunde in den Brutschrank (37°) zu stellen. Die angewandte Verdünnung war 1:500.

Übrigens zeichneten sich die choleraähnlichen Vibrionen besonders dadurch aus, dass sie schwer zu verreiben waren, oft war es garnicht möglich.

Ich bin am Schluss meiner Untersuchungen. Durch sie glaube ich dargelegt zu haben, dass der von Hirschbruch und Schwer empfohlene Specialagar, den ich jedoch ausschliesslich mit Rindfleischboullion hergestellt wissen will, eine Bereicherung unseres Materials bedeutet, das im Dienste der Choleradiagnose steht.

Wenn die Vibrionenkolonieen auch nicht nach 10 Stunden an ihren Characteristica zu erkennen sind, so ist dieses nach 14 Stunden mir stets möglich gewesen und zwar mit einer Leichtigkeit und Klarheit, wie es auf der gewöhnlichen Agarplatte für ausgeschlossen gelten kann. Von dieser schreibt freilich Koch, dass sie imstande sei, nach 10 Stunden (nach Kolle in 8—12 Stunden) isolierte, zur Weiterbehandlung brauchbare Kolonieen zu liefern. Wenn der Specialagar das erst nach 14 Stunden vermag, so wird diese geringe Zeitdifferenz durch seine Vorzüge aufwogen, sodass ich mich ebenfalls der Hoffnung hingebe, dass das Verfahren auch im Ernstfalle der Kritik stand halten wird.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrat Fraenkel für die Überlassung der Arbeit sowie für die Übernahme des Referates meinen aufrichtigsten Dank zu sagen.

# Litteratur.


Buchner, Archiv f. Hygiene III. 361. 1885.
Behring, Zeitschr. f. Hygiene VII. 171. 1889.
Flügge, Zeitschr. f. Hygiene XIV. 195. 1893.
Koch, Zeitschr. f. Hygiene XIV. 319. 1893.
Gruber, Archiv f. Hygiene XX. 123. 1894.
Friedrich, P. Arb. a. d. k. Gesundhtsamt. Bd. 8. 465. 1893.
Petruschky, Centralbl. f. Bakterien. VII. 53. 1890.
Smith, „ „ „ VIII. 390. 1890.
Smith, „ „ „ XVIII. 1. 1890.
Gosio, Archiv f. Hyg. XXII. 1. 1895.
v. Drigalsky-Conradi, Zeitschr. f. Hyg. XXXIX. 283. 1902.
Kolle, klinisches Jahrb. Bd. XI. Hft. III. 1903.
Hirschbruch u. Schwer, Klin. Jahrb. XII., 249. 1904.
Hirschbruch u. Schwer, Hyg. Rdsch. 1903. 864.
Hirschbruch u. Schwer Centralblatt. XXXIV. 585.
Hirschbruch u. Schwer Centralblatt. XXXII. 144.

# Lebenslauf.

Als Sohn evangelischer Eltern wurde ich, Karl Rudolf Eduard Besser, am 11. XII. 1880 zu Quedlinburg am Harz geboren. Nach $9^1/_2$ jährigem Besuche des dortigen Gymnasiums bestand ich Michaelis 1899 die Reifeprüfung. Am Schlusse des 4. Semesters bestand ich in Kiel das Physikum, nachdem ich hier 2 Semester, je eins in Berlin und in Heidelberg verbracht hatte. Im fünften Semester, Mich. 1901—Ostern 1902 erledigte ich das erste militärische Diensthalbjahr. Alsdann studierte ich noch 4 Semester in Berlin, bestand nach einem Studium von 2 Semestern in Halle im Sommersemester 1905 hier das Staatsexamen und am 9. März 1906 das Colloquium.

Am 15. August 1905 erhielt ich die Erlaubnis, in das praktische Jahr eintreten zu dürfen. Bis zum 30. November 1905 war ich als Medicinal-Praktikant auf dem Königl. hyg. Institut der hiesigen Universität, vom 1. Dezember ab an der medicinischen Poliklinik der hiesigen Universität zunächst als Medicinal-Praktikant, vom 1. Januar 1906 an als Assistent beschäftigt. Die Approbation erhielt ich am 1. August 1906.

Während meiner Studienjahre war ich dankbarer Schüler in Heidelberg:

von Maurer, Quinke, Bütschli, Krafft, Kindermann;

in Kiel:

von Flemming, Hensen, Lenard, Graf v. Spee, Bilz, Klein;

in Berlin:

von Waldeyer, Hertwig, F. E. Schultze, Engler, Kraus, v. Bergmann, König, Gusserow, Olshausen, Orth, Liebreich, Lesser, Jürgens, Israel, H. Virchow, F. Klemperer, W. Nagel, Strauss, Albu, Bennecke †, Martens, Horstmann, Jäckel;

in Halle:

Frhr. v. Mering, v. Bramann, Veit, Schmidt-Rimpler, Fraenkel, Eberth, Wernicke †, Nebelthau, Haasler, Grunert † und Stoeltzner.